

UROGENITALNE INFEKCIJE IZABRANA POGLAVLJA

UROGENITAL INFECTIONS SELECTED CHAPTERS

Biofilmske infekcije urinarnog trakta

Biofilm Associated Urinary Tract Infections

Miro Morović

Opća bolnica Zadar

Odjel za infektologiju

23000 Zadar, Bože Peričića 5

Sažetak Biofilm je složena zajednica mikroorganizama s jedinstvenim načinom života i danas je glavni uzrok infekcija nastalih u zdravstvenoj skrbi. Biofilmske infekcije ne reagiraju odgovarajuće na terapijske koncentracije antibiotika i razvijene su brojne strategije u nastojanju da se spriječi nastanak ili eradicira biofilm. Infekcije urinarnog trakta vezane na kateter najčešće su i najtipičniji primjer biofilmskih infekcija; do danas nije pronađen materijal za izradu katetera s mogućnošću sprječavanja nastanka biofilma. Autor sažeto prikazuje mehanizme nastanka biofilma u urinarnom traktu te različite pristupe sprječavanju i liječenju tih infekcija.

Ključne riječi: biofilmske infekcije, urinarni trakt

Summary Biofilms, complex microbial communities with a unique mode of life, currently play a dominant role in health-care-associated infections. Biofilm-associated infections usually do not respond adequately to therapeutically achievable concentrations of antibiotics, and many alternative strategies to prevent and eradicate biofilms have been investigated. Catheter-associated urinary tract infection is the most frequent and typical example of biofilm and no catheter capable of resisting encrustation by biofilm has been developed so far. The author summarizes the mechanisms of biofilm formation in the urinary tract and different approaches to the prevention and treatment of associated infections.

Key words: biofilm associated infections, urinary tract

U biomedicinskoj areni kolonizacija bakterija i nastanak biofilma danas su najčešći i najveći terapijski problem. Računa se da je 60 - 85% infekcija prirodnih površina (koža, sluznice, kosti) ili onih s izvorom u abiotičkim materijalima koji se rabe u medicini posljedica nastalog biofilma.

Prema definiciji biofilm je sesilna zajednica mikroorganizama vezanih ireverzibilno međusobno i na supstrat i uklopljenih u izvanstanični polimerni matriks koji su sami proizveli.

U nastanku biofilma prvo se planktonična bakterija veže na površinu ili na prethodno vezane bakterije, adhezijskim molekulama, nakon čega se počinje razmnožavati tvoreći mikrokolonije; nakon toga bakterije počinju lučiti egzopolisaharide tvoreći tako jedan trodimenzionalni biofilm; može se dogoditi da pojedinačne bakterije i napuste taj matriks uz pomoć polisaharidne liazze.

Mikroorganizmi su unutar biofilma organizirani u tzv. *quorum sensingu*, tj. u međusobnoj komunikaciji mogu ubrzano izmjenjivati transmisibilne genske materijale i razne produkte koji mogu difundirati iz jedne stanice u drugu. Tako se mogu prenijeti i faktori virulentnosti i rezistencije, što mikroorganizmima olakšava preživljavanje i daje im prednost u odnosu prema slobodnim organizmima.

Rast i razmnožavanje bakterija u biofilmu znatno su spo-

riji, a metaboličke potrebe znatno manje nego u tekućem mediju i takav "prazni metabolizam" osnova je rezistencije i tolerancije na antibiotike. Osim toga i izvanstanični polimeri čine određenu difuzijsku zapreku za antibiotike, koji penetriraju vrlo sporo dajući tako vremena ekspresiji gena rezistencije. Razvijeni biofilm može tako podnijeti 10 - 1.000 puta višu koncentraciju antibiotika od one koja je potrebna da ubije planktoničnu bakteriju.

U medicini su brojni primjeri nastanka biofilma: kateteri (vaskularni, urinarni), stentovi (bilijarni, ureteralni, vaskularni), sonde, očne leće (silikonske, akrilne), umjetni zalis-ci, zglobovi.

Biofilm je od bitnog patogenetskog značenja i u brojnim akutnim i kroničnim infekcijama. Tipično nastaje u tijeku legionarske bolesti, leptospiroze, kolere, ali i u intoksikacijama hranom (salmonela, ešerihije). U kroničnim infekcijama najprije je prepoznat u nastanku karijesa, parodontitisa, endokarditisa (umjetnih i nativnih zalistaka), kroničnom otitisu srednjeg uha, sinuitisu, u cističnoj fibrozi pankreasa, u infekcijama kod opekline, bubrežnih kamenaca, u kroničnom prostatitisu.

Učestalost infekcija uzrokovanih medicinskim implantatima različita je. Na primjeru vaskularnih katetera danas se računa da je učestalost infekcija zbog centralnih venskih

katetera 8,5-19,8 infekcija na 1.000 kateter-dana. Biofilm se može razviti već unutar 3 dana od postavljanja katetera; pretežno nastaje na vanjskoj površini katetera unutar prvih 10 dana, a s duljom kateterizacijom pretežno u lumenu. U slučaju urinarnih katetera učestalost infekcija ovisna je o trajanju kateterizacije, u slučaju proteza dojki 1-7%, vaskularnih presađaka oko 1,5%, umjetnog kuka 2,6-4,0%, koljena 3,5-4% (1).

U slučaju postavljanja urinarnih katetera dugotrajna kateterizacija (> 4 tj.) dovodi do bakteriurije u 100% bolesnika zbog enkrustacije kristalnim depozitima biofilma; posljedično dolazi do začepljenja katetera, blokade protoka urina i prelijevanja van ili pak do retencije i vezikoureteralnog refluksa s pijelonefritisom, sepsom (2).

Kako bi se spriječila ta enkrustacija kristalima struvita (Mg-sol) i apatita (Ca-sol), proizvedeni su kateteri od različitog materijala, ali na laboratorijskom modelu kolonizacije *P. mirabilis* pokazalo se da nema učinkovita načina da se spriječi nastanak biofilma, a prosječno vrijeme do blokade urina variralo je od 21 do 56 sati (3).

Druge vrste, kao *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* ne stvaraju kristalične biofilme, ali luče znatne količine egzopolisaharida i stvaraju tzv. mukoidne biofilme, koji također mogu okludirati katetere (2).

Sastav biofilma može imati znatan učinak na antimikrobnost osjetljivost. Primjerice u miješanom biofilmu *S. epidermidis* i *C. albicans* stafilokokni izvanstanični polimeri štite gljive od azola i obratno, gljive smanjuju učinkovitost van-komicina (4). Na primjeru biofilma *A. xylosoxidans* pokazalo se da se i nemikrobne komponente domaćina, kao eritrociti i fibrin mogu akumulirati u kateterskom biofilmu i narušiti difuziju antibiotika u biofilm (primjer vaskularnog katetera) (5).

U kontroli nastanka biofilma razvijene su brojne strategije. U nekim se rabe antibiotici sistemski ili kao ugradbeni materijal u kateterima. U slučaju primjene sistemskih antibiotika dolazi do mogućnosti eliminiranja bakterija iz periferije, ali i nepotpune eradikacije biofilma, što rezultira pojavom rezistentnih sojeva bakterija. U drugima se ne uključuju antimikrobni agensi, a kao antibiofilmski materijali rabe se primjerice kelatni metalni kationi kalcij, magnezij i željezo koji mogu destabilizirati strukturu biofilma mehanizmom deplecije esencijalnih kationa iz bakterijskih stanica; 70%-tni etanol također se pokazao učinkovitim u biofilmu *C. albicans*; nadalje, disperganti biofilma kao klor, surfaktant, enzimi također mogu degradirati biofilm *C. albicans*. Jedna od posljednjih strategija je inficiranje bakterija bakteriofagima, kao na primjer *P. aeruginosa*, što dovodi do razmnožavanja faga u stanici, od kojih neki sojevi luče polisaharidne depolimeraze koje mogu razgraditi izvanstanični matriks (6, 7).

Urinarne katetere koloniziraju brojne bakterijske vrste, a najčešće se radi o miješanim biofilmovima; najčešći izolati su *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *P. mirabilis* (tablica 1) (8).

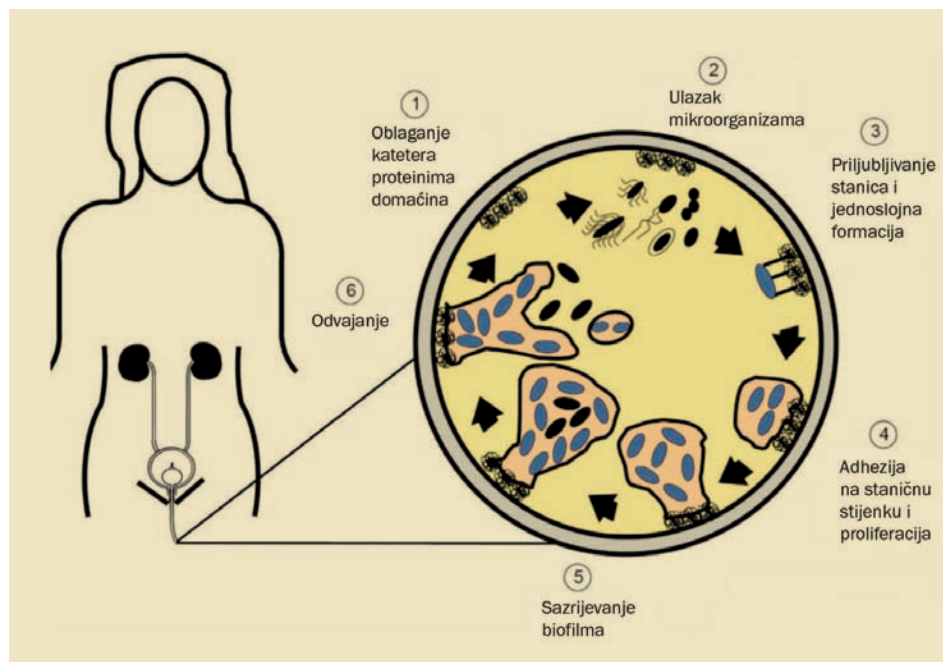
Tablica 1. Incidencija bakterijskih vrsta izoliranih iz 106 kateterskih biofilмова

Vrsta	Broj (%) katetera koloniziranih svakom vrstom		
	Svi kateterski biofilmovi	Biofilmovi miješanih vrsta (76 katetera)	Biofilmovi jedne vrste (30 katetera)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38 (35,9)	31 (40,8)	7 (23,3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	36 (34,0)	34 (44,7)	2 (6,7)
<i>Escherichia coli</i>	33 (31,1)	31 (40,8)	2 (6,7)
<i>Proteus mirabilis</i>	32 (30,2)	26 (34,2)	6 (20,0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19 (17,9)	18 (23,7)	1 (3,3)
<i>Morganella morganii</i>	14 (13,2)	11 (14,5)	3 (10,0)
<i>Providencia stuartii</i>	11 (10,4)	9 (11,8)	2 (6,7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (10,4)	10 (13,2)	1 (3,3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	9 (8,5)	7 (9,2)	2 (6,7)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9 (8,5)	8 (10,5)	1 (3,3)
<i>Providencia rettgeri</i>	5 (4,7)	4 (5,3)	1 (3,3)
Koagulaza-negativni stafilokoki	5 (4,7)	4 (5,3)	1 (3,3)
<i>Citrobacter species</i>	4 (3,8)	4 (5,3)	0 (0,0)
<i>Proteus vulgaris</i>	3 (2,8)	2 (2,6)	1 (3,3)

Patogeneza nastanka biofilma na urinarnim kateterima: insercijom katetera stvara se mogućnost unošenja uropatogena u mokraćni mjehur. Većinom su to mikroorganizmi fekalne flore ili periuretralnog područja (rijetko tranzitorna mikroflora bolničkog osoblja ili drugog bolesnika).

Bakterije ulaze u mjehur većinom (oko 66%) migracijom s periuretralne kože uzduž prostora između vanjske površine katetera i epitelne površine uretre, a rjeđe (34%) migracijom kroz lumen katetera u vrijeme njegova postavljanja ili kontaminacijom urina u drenažnoj vrećici (slika 1) (9).

Dijagnostički kriteriji biofilmske infekcije složeniji su nego u akutnim infekcijama jer se većinom radi o asimptomatskim infekcijama ili infekcijama s umjerenim simptomima, sporog tijeka i s rezistencijom na uobičajenu terapiju. Dok je izolacija mikroorganizma u kulturi relevantna za akutnu infekciju, u biofilmskim infekcijama kultura je pozitivna samo u oko 30% slučajeva, a i u tim slučajevima teško je razlučiti je li taj nalaz samo kolonizacija ili infekcija. U tom smislu modificirani su i Parsek-Singhovi kriteriji biofilmskih infekcija uvođenjem adekvatnijih dijagnostičkih metoda, RT-PCR i FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija) koje daju pozitivne nalaze i do 80%, uz dokaz upalne reakcije prisutnošću makrofaga i polinukleara *in situ* oko agregiranih bakterija (10).



Slika 1. Patogeneza stvaranja biofilma na urinarnim kateterima

Dijagnostički kriteriji biofilmske infekcije jesu:

- Patogene bakterije vezane na površinu.
- Izravni dokaz nakupine stanica uklopljenih u matriks u inficiranom tkivu.
- Infekcija na određenom organskom sustavu.
- Rezistencija na antibiotsku terapiju unatoč dokazu (RT-PCR ili FISH metoda) osjetljivosti planktoničnih bakterija.
- Negativni nalaz kulture unatoč klinički jasnoj infekciji (bakterije biofilma ne moraju se dokazati u standardnim uzorcima krvi ili aspiratu).
- Neučinkovitost obrane domaćina (PMN, makrofagi) unatoč upalnoj reakciji.

Dijagnoza simptomatske infekcije urinarnog trakta u kateteriziranih bolesnika prema smjernicama CDC podrazumijeva najmanje jedan od ovih kriterija (11):

1. Bolesnik s urinarnim kateterom i najmanje jednim od znakova i simptoma bez drugog prepoznatljivog uzroka: vrućica $> 38^{\circ}\text{C}$, suprapubična bolnost ili bolnost lumbalne lože i pozitivna kultura urina s $\geq 10^5$ CFU/ml s ne više od 2 vrste mikroorganizama.
2. Bolesnik s urinarnim kateterom i najmanje jednim od znakova i simptoma bez drugog prepoznatljivog uzroka: vrućica $> 38^{\circ}\text{C}$, suprapubična bolnost ili bolnost lumbalne lože i pozitivna kultura urina s dokazom najmanje jednog od ovih nalaza:
 - a. Pozitivna leukocitna esteraza i/ili nitritni test trakom
 - b. Piurija (uzorak urina s ≥ 10 leukocita/mm³ ili ≥ 3 leukocita u vidnom polju nativnog urina)
 - c. Mikroorganizmi u bojenju nativnog urina po Gramu i

jedna pozitivna kultura urina s $\geq 10^3$ i $< 10^5$ CFU/ml s ne više od 2 vrste mikroorganizama.

Prevenција: s obzirom na to da je terapija tih infekcija teška, danas se preporučuje niz preventivnih mjera, a na prvom je mjestu izbjegavanje nepotrebne kateterizacije: računa se da je oko 30% prvih kateterizacija nepotrebno, kao i 30-50% kontinuiranih kateterizacija. Drugim riječima za postavljanje urinarnog katetera postoje odgovarajuće indikacije (11).

Osim pitanja potrebe kateterizacije od bitnog je značenja i kontrola duljine kateterizacije; druge mjere jednako važne jesu pranje ruku prije postavljanja katetera i kontrola položaja katetera (mehanička opstrukcija).

U prevenciji se rabe kao što je istaknuto različite vrste katetera, impregniranih srebrom, antibioticima, ali svi s ograničenim učinkom (12).

U slučaju simptomatske infekcije kateter treba odstraniti/zamijeniti, zbog visoke učestalosti relapsa, uzeti uzorke urina novim kateterom (sadržaj starog katetera su različite vrste i veći broj bakterija) i tada ordinirati antibiotsku terapiju.

Rezistencija biofilma: unutar biofilma bakterije su dobro zaštićene od učinka antibiotika i imunosti obrane organizma. Učinak antibiotika ograničavaju smanjene metaboličke potrebe bakterija, smanjena penetracija kroz matriks, smanjena sinteza proteina stanične stijenke, razvoj rezistencije i tolerancije.

Različiti antibiotici imaju različit učinak na biofilm. Jasno je da antibiotici koji djeluju na razini inhibicije sinteze stanične stijenke (beta-laktami, glikopeptidi) imaju slab učinak. Lijekovi koji mogu penetrirati u matriks biofilma i imaju određenu učinkovitost jesu rifampin, fluorokinoloni i ma-

krolidi ili kombinacije nekih od njih, npr. rifampina i linezolid u stafilokoknom biofilmu, ili gentamicina i ampicilina, vankomicina ili linezolid u enterokoknom biofilmu.

Na primjeru *in vitro* modela *Stenotrophomonas maltophilia* biofilma pokazalo se da ciprofloksacin može značajno reducirati broj vijabilnih stanica i time reducirati masu biofilma, premda je ispitivanje minimalne koncentracije kod koje bakterije mogu ponovo rasti pokazalo da sama monoterapija nije dostatna (13).

Istraživanja zadnjih godina pokazala su da postoje prirodne površine koje zbog svojih fizičkih i kemijskih svojstava mogu kontrolirati rast nepoželjnih bakterija: koža morskog psa, površina školjke i morskog raka (14).

Koža morskog psa prekrivena je brojnim ljuščicama koje su građene od istog materijala kao njegovi zubi i biolozi ih zovu "dermalnim dentikulima"; te su ljuske pokretne i

smanjujući trenje, olakšavaju mu plivanje. Osnova građe je dentin, čvrsti kristalni materijal uklopljen u mekšu proteinsku strukturu.

Današnjom tehnologijom površinske mikrotopografije, nazvane "Sharklet" tehnologijom mogu se dizajnirati strukture koje imitiraju kožu morskog psa. S pomoću jednog polielastomera mogu se stvoriti strukture uske i do 2-3 mikrona visine koje mogu inhibirati kolonizaciju većih bakterija kao npr. *S. aureus*.

U usporedbi s biološkom kontrolom na kojoj kolonije biofilma nastaju već nakon 7 i 14 dana, a 14. dana već je 54% glatke površine prekriveno kolonijama *S. aureus*, na Sharklet površini ta je razina kolonizacije bila samo oko 7% ($p < 0,01$) (15).

Zaključno, problem nastanka biofilma u medicini daleko je još od rješenja.

Literatura

- KATSIOGIANNI M, MISSIRLIS YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* 2004;8:37-57.
- STICKLER DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol* 2008;5(11):598-608.
- MORRIS NS, STICKLER DJ, WINTERS C. Which indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms? *Br J Urol* 1997;80(1):58-63.
- ADAM B, BAILLIE GS, DOUGLAS LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002;51(4): 344-9.
- DONLAN RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner 2011; *Clin Infect Dis* 52(8):1038-45.
- DONLAN RM. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis* 2011;52(8):1038-45.
- TENKE P, KOVES B, NAGY K i sur. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World J Urol* 2012;30(1):51-7.
- MACLEOD SM, STICKLER DJ. Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt11):1549-57.
- JACOBSEN SM, STICKLER DJ, MOBLEY HL i sur. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(1):26-59.
- HALL-STOODLEY L, STOODLEY P. Evolving concept in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11(7):1034-43.
- GOULD CV, UMSCHIED CA, AGARWAI RK i sur. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(4):319-26.
- CHENOWETH CE, SAINT S. Urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 2011;25(1):103-15.
- PASSERINI DE ROSSI, GARCIA C, CALENDI M i sur. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34(3):260-4.
- MAGIN CM, COOPER SP, BRENNAN AB. Non-toxic antifouling strategies. *Materials Today* 2010;13(4):36-44.
- CHUNG KK, SCHUMACHER JF, SAMPSON EM i sur. Impact of engineered microtopography on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Biointerphases* 2007;2(2):89-94.

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Miro Morović, dr. med.
Opća bolnica Zadar
Odjel za infektologiju
23000 Zadar, Bože Perićića 5

Primljeno/Received:

30. 1. 2012.
January 30, 2012

Priljučeno/Accepted:

6. 2. 2012.
February 6, 2012